



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Estudio de la Actividad Serín-Proteasa en la
fracción soluble de promastigotes de *Leptomonas* sp.

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre

Universidad Central de Venezuela

Por el bachiller Armando R. Gutiérrez G.

como requisito parcial para optar al título

de Licenciado en Biología.

Tutora: Dra. Elizabeth Valdivieso

Caracas, Venezuela

Agosto, 2011

RESUMEN.

En parásitos protozoarios, las proteasas juegan un papel importante en la patogénesis de las enfermedades parasitarias. Hasta la fecha se han reconocido numerosas proteasas parasitarias; sin embargo, son el grupo de las serín-proteasas las menos estudiadas. En géneros patógenos pertenecientes a la familia de los Trypanosomatidae, las serín-proteasas han sido asociadas a la supervivencia de estos parásitos; no obstante, en tripanosomátidos monogenéticos no se han identificado esta clase de proteasas. En el presente trabajo, se identificó por primera vez la presencia de una actividad serín-proteasas en la fracción soluble (FS) de promastigotes de *Leptomonas seymouri*, la cual fue capaz de hidrolizar el sustrato sintético Bz-Arg-pNA ($_L$ -BAPNA) en un rango de pH comprendido entre pH 6-10 con un óptimo de actividad a pH 8. Esta actividad proteolítica fue inhibida por el TLCK, la Leupeptina y el AEBSF (inhibidores selectivos de serín-proteasas). Curiosamente, otros inhibidores de esta clase de proteasas como la Aprotinina y el PMSF no tuvieron efecto. Por otro lado, los inhibidores de cisteín, aspartil y metalo-proteasas tampoco tuvieron efecto sobre la hidrólisis del sustrato $_L$ -BAPNA, indicando que la actividad identificada bajo nuestras condiciones experimentales, se trata de una serín-proteasa. Con el fin de ahondar en el entendimiento del papel que cumplen este tipo de enzimas en estos parásitos, se realizaron estudios del efecto del inhibidor de serín-proteasas TLCK (1 μ M, 100 μ M) sobre la proliferación y morfología de los promastigotes de *L. seymouri*. Las concentraciones utilizadas de este compuesto no tuvieron efecto; sin embargo, son necesarios más estudios con otros inhibidores de serín-proteasas, para establecer o no una relación directa entre la actividad identificada en la fracción soluble y la proliferación celular.

INDICE GENERAL.

INTRODUCCIÓN.....	1
1. Serín-proteasas.....	6
OBJETIVOS.....	9
Objetivo general.....	9
Objetivos específicos.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
1) Cultivo celular.....	10
2) Obtención de extractos celulares.....	10
3) Determinación de proteínas.....	10
4) Identificación y Caracterización de la actividad serín-proteasa presente en la FS de promastigotes de <i>L. seymouri</i>	11-13
5) Efecto del inhibidor de serín-proteasas TLCK sobre la proliferación de promastigotes de <i>L. seymouri</i>	13-14
6) Efecto del inhibidor de serín-proteasas TLCK sobre la morfología de promastigotes de <i>L. seymouri</i>	14
RESULTADOS.....	15
1) Detección de la actividad serín-proteasas sobre geles de poliacrilamida-gelatina.....	16
2) Degradación de BSA por la FS de promastigotes de <i>L. seymouri</i>	16

3) Hidrólisis del sustrato sintético L-BAPNA por la FS de promastigotes de <i>L. seymouri</i>	16
3.1) Efecto del pH sobre la hidrólisis del péptido sintético L-BAPNA por la FS de promastigotes de <i>L. seymouri</i>	17
3.2) Efecto de inhibidores de proteasas, sobre la hidrólisis del sustrato sintético L-BAPNA por la FS de promastigotes de <i>L. seymouri</i>	17-18
4) Efecto del TLCK sobre la proliferación y morfología de promastigotes de <i>L. seymouri</i>	19
DISCUSIÓN.....	20
CONCLUSIONES.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30

INDICE DE FIGURAS.

	Pág
Figura 1. Ciclos de vida de los géneros tripanosomátidos.	2
Figura 2. Degradación de BSA por la FS de promastigotes de <i>L. seymouri</i>	15
Figura 3. Hidrólisis del sustrato $_L$ -BAPNA por la FS de promastigotes de <i>L. seymouri</i>	16
Figura 4. Efecto del pH sobre la hidrólisis del sustrato sintético $_L$ -BAPNA por la FS de promastigotes de <i>L. seymouri</i>	17
Figura 5. Efecto de inhibidores de proteasas sobre la hidrólisis del sustrato $_L$ -BAPNA por la FS de promastigotes de <i>L. seymouri</i>	18
Figura 6. Curva de crecimiento de promastigotes de <i>L. seymouri</i> a diferentes concentraciones de TLCK.....	19
Figura 7. Estructura química del sustrato sintético $_L$ -BAPNA.	22

INDICE DE TABLAS.

	Pág
Tabla 1. Principales proteasas de parásitos protozoarios identificados.	5
Tabla 2. Inhibidores utilizados en la caracterización de la actividad enzimática.	25

ABREVIATURAS.

AEBSF	“4-(2-Aminoetil) bencenosulfonil fluoruro, HCl”.
Bz	Benzamidina.
E-64	“trans-epoxisuccinil-L-leucilamida -(4-guanidino)-butano”
F.S	Fracción soluble.
OPB	Oligopeptidasa B.
OP-Tc	Serín oligopeptidasa de <i>Trypanosoma congolense</i> .
PMSF	“Fenilmetiletilsulfonil fuoruro”
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
TLCK	“N- <i>p</i> -tosil-L-lisina clorometil cetona”
TPCK	“N- <i>p</i> -tosil-L-fenilalanina clorometil cetona”
_L -BAPNA	Bz-Arg-pNA.
_L -TAMED	“ α -N- <i>p</i> -tosil-L-arginil-metil ester”

INTRODUCCIÓN.

Los parásitos protozoarios son un grupo de organismos unicelulares que pertenecen al reino Protista. Algunos de estos organismos infectan humanos, por lo que han sido señalados como los causantes de algunas enfermedades infecciosas importantes en el mundo.

Los Trypanosomatidae son un grupo de parásitos eucarióticos con amplio espectro de hospederos. Se conoce que esta familia se compone de distintos géneros de protozoos monoflagelados. Cinco de estos géneros sólo se encuentran como parásitos de hemípteros y artrópodos dípteros, mientras que los otros tres géneros tienen ciclos de vida digenético en los vertebrados e invertebrados. Los tripanosomátidos con un ciclo de vida digenético, están representados por los géneros *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum* y *Phytomonas* (Fig 1); entre los que destacan: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y varias especies de *Leishmania* (Vickerman, 1994; Camargo, 1999). *Leishmania spp* dependiendo de la especie produce diferentes lesiones que dan lugar a la leishmaniasis, enfermedad que afecta a 12 millones de personas en el mundo (Croft y Coombs, 2003). *Trypanosoma cruzi* es el agente causal del mal de Chagas, una enfermedad que afecta a 20 millones de personas a nivel mundial de las cuales mueren entre un 10% y 20% (Gelb y Wim, 2002) y *Trypanosoma brucei*, agente causante de la enfermedad del sueño de África (Vickerman, 1994; Camargo, 1999). Algunas especies pertenecientes al género *Phytomonas* pueden inducir enfermedades graves en plantas (Vickerman, 1994; Camargo, 1999), estos parásitos trypanosomatideos tienen ciclos de vida complejos los cuales implican múltiples hospedadores (Fig 1).

Además de los géneros digenéticos, se encuentran varios géneros monogenéticos (*Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas*, *Rhynchoidonas*, *Leptomonas*) (Fig 1)

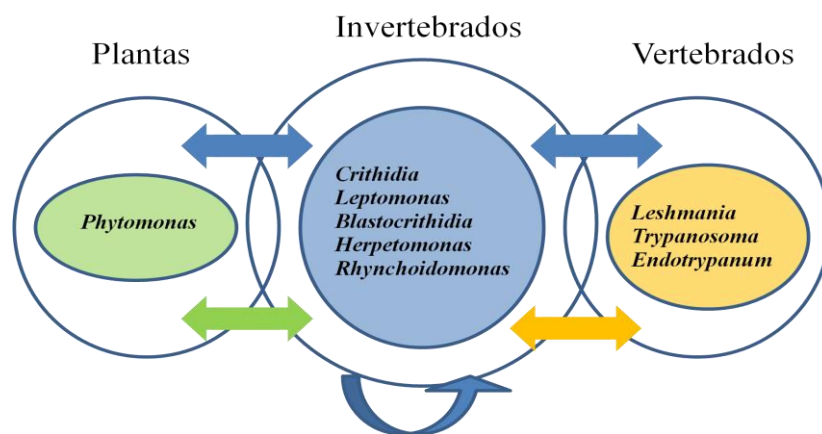


Figura 1. Ciclos de vida de los géneros tripanosomátidos. Tomado con modificaciones de Santos y col (2007).

De todos los géneros pertenecientes a la familia Trypanosomatidae, es *Leptomonas* probablemente el más primitivo. Este presenta un flagelo de inserción anterior y el cuerpo basal situado por debajo del núcleo. Durante su ciclo de vida, los promastigotes se encuentran normalmente en el intestino anterior del hospedador. Cuando el parásito alcanza la región posterior, pasa a la forma de amastigotes transformándose en quistes, que son la forma infectiva del parásito. Los quistes salen al exterior mediante las heces, y cuando estos son ingeridos por el hospedador se produce el desenquistamiento. Cada nuevo organismo alcanzará la forma de promastigote para comenzar nuevamente el ciclo (Cheng, 1978).

El género *Leptomonas*, presenta numerosas ventajas, por lo que ha sido utilizado como modelo para diversos estudios bioquímicos (Schneider y Glaser, 1993; Nogueira de Melo y col., 2001). Entre estas ventajas se encuentra la facilidad de cultivo y la no patogenicidad para humanos. Además, los tripanosomátidos monogénéticos han sido usados como modelos comparativos de estudio para ayudar a comprender la fisiología, la bioquímica, la ultraestructura y la genética de las especies patógenas (Schneider y Glaser, 1993; Jaffe y Dwyer, 2003) con importancia médica, tales como los tripanosomátidos que infectan a vertebrados (por ejemplo, *Trypanosoma brucei*, *T. congolense*, *T. cruzi* y

Leshmania sp.) e importancia económica en el caso de tripanosomátidos que infectan plantas (por ejemplo *Phytomonas sp*) (McGhee y Cosgrover, 1980).

En este contexto se han llevado a cabo numerosas investigaciones que buscan principalmente ampliar los conocimientos sobre la biología de los tripanosomátidos, cuyo propósito fundamental es el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas y preventivas que ayuden a combatir de forma eficaz las enfermedades causadas por estos organismos. Existen numerosos factores asociados al proceso infectivo y a la supervivencia de los protozoarios en sus respectivos hospederos, siendo resaltante el papel que juegan las enzimas proteolíticas.

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace peptídico (Mckerrow, 1989). Constituyen un grupo de enzimas que difieren en sus propiedades tales como la especificidad del sustrato, sitio activo, mecanismo de catálisis, pH y temperatura óptima. Las proteasas pueden ser endopeptidasas, si clivan un enlace peptídico interno. Las exopeptidasas clivan enlaces peptídicos en los extremos amino o carboxil terminal de la proteína (Mckerrow y col, 1993). También pueden ser clasificados de acuerdo al mecanismo utilizado durante el proceso hidrolítico. Las serín-proteasa, treonin-proteasa, cisteín-proteasa y aspartil-proteasas, reciben su nombre por la presencia de un aminoácido específico en el sitio activo, y las metalo-proteasas que requieren de un ión metálico para la catálisis (Mason, 1991; Barrett y col, 2001).

En los mamíferos se conocen diversas funciones para las proteasas. Están involucradas en los procesos digestivos, procesamiento y ensamblaje molecular de cadenas polipeptídicas para el procesamiento de precursores de hormonas, en la cascada de la coagulación, la fibrinólisis, la reacción del complemento en el sistema inmunológico, entre otras funciones. (Beynon y Bond, 1989)

En parásitos protozoarios las proteasas juegan un papel importante en la patogénesis de las enfermedades parasitarias. Las proteasas facilitan la invasión de las células del hospedador, participan en la digestión de las proteínas del hospedador, ayudan al parásito a evadir las respuestas inmunes y previenen la coagulación sanguínea, entre otras (McKerrow, 1989; McKerrow y col, 1993; Chang y col, 2003).

En la actualidad se ha reconocido la presencia de numerosas proteasas en parásitos. La caracterización de las proteasas parasitarias tiene importantes implicaciones para la comprensión de los mecanismos de patogenicidad del parásito. Rosenthal (1999) hace una recopilación bibliográfica de algunas de las proteasas identificadas y caracterizadas en protozoarios señalando su función en el parásito (Tabla1), observándose representantes de las cuatro principales clases de proteasas; sin embargo, son el grupo de las serín-proteasas las menos estudiadas.

Debido a que algunas de las proteasas parasitarias poseen diferencias significativas entre el parásito y el humano, además de ser esenciales para el crecimiento del parásito y su supervivencia (Ridley, 1997), se consideran buenos blancos para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos, permitiendo el desarrollo de nuevos métodos para la prevención, tratamiento y control de las enfermedades (Wang, 1997).

Tabla 1. Principales proteasas de parásitos protozoarios identificados*

Parásito	Clases (nombres)	Función(es) putativa(s)	Referencias Bibliográficas
<i>Leishmania</i>	Metalo (leishmanolisina)	Clivaje del complemento; proteólisis intracelular.	Bovier y col, 1985; Bovier y col, 1995; Chan y col,1990; Olafsom y col, 1990
	Cisteín	Proteólisis intracelular.	Coombs,1982;Pupkis y Coombs,1984;Pupkis y col., 1986;Robertson y Coombs,1990
	Serín (Oligopeptidasa B)	Evasión a la respuesta inmune del hospedador	Swenerton y col, 2010
	Aspartíl	Proliferación parasitaria.	Valdivieso y col, 2006
<i>Trypanosoma brucei</i>	Cisteín	Diferenciación parasitaria.	North y col, 1983; Lonsdale-Eccles y Mpimbaza, 1986; Lonsdale-Eccles y Grab, 1987; Robertson y col, 1990; Troeberg y col, 1996
	Serín (oligopeptidasa)	Proteólisis extracelular.	Huet y col., 1992; Kornblatt y col.,1992;Troeberg y col.,1996
	Metalo	Clivaje de complemento.	El-Sayed y Donelson, 1997
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Cisteín (cruzaina o cruzipaina)	Diferenciación parasitaria. Invasión de células hospederas.	Cazzulo y col, 1989,1990; Eakin y col, 1992
	Serín oligopeptidasa	Mediador en señalización por calcio.	Ashall, 1990; Santana y col, 1992: Troeberg y col, 1996
	Metalo	Diferenciación parasitaria.	Bonaldo y col, 1991
	Proteasoma	Desarrollo y diferenciación parasitaria.	Gonzalez y col, 1996
	Colagenasa	Infección de célula hospedera.	Santana y col, 1997
<i>Plasmodium</i>	Cisteín (falcipaina)	Degradación de hemoglobina.	Rosenthal y col, 1988; Rosenthal y Nelson, 1992.
	Aspartíl (plasmepsinas I y II)	Degradación de hemoglobina.	Goldberg y col, 1991; Vander Jagt y col, 1992; Dame y col, 1994; Hill y col, 1994; Coombs y col, 2001
	Aminopeptidasa	Hidrólisis peptídica de globinas.	Curley y col, 1994
	Serín	Ruptura y/o invasión de eritrocitos.	Rosenthal y col, 1987; Braun-Breton y col, 1988
	Cisteín	Ruptura y/o invasión de eritrocitos.	Bernard y Schrevel, 1987; Scherevel y col, 1988; Grellier y col, 1989; Mayer y col, 1991.
<i>Entamoeba histolytica</i>	Cisteín (amoebapaina)	Invasión tisular, activación de complemento.	Scholze y Werries, 1984; Lushbaugh y co, 1985; Keene y col, 1986; Luaces y Barrett, 1988
	Colagenasa	Invasión tisular.	Munoz y col, 1982; Rosales-Encina y col, 1992
	Proteasoma	Proteólisis citosólica Enquistación	Scholze y col, 1996
<i>Giardia</i>	Cisteín	Enquistación.	Hare y col, 1989; Parenti, 1989; Werries y col, 1991
<i>Trichomonas</i>	Cisteín	Unión a células epiteliales.	Coombs y North, 1983; Lockwod y col, 1987; Neale y Aderete, 1990; North y col, 1990
<i>Leptomonas</i>	Metalo (leishmanolisina)	Proteólisis intracelular	Jaffe y Dwyer, 2003
<i>Toxoplasma</i>	Cisteín	Proteólisis intracelular.	Choi y col, 1989
	Cisteín	Invasión de células hospederas.	Nesterenko y col, 1995

* Tomado con modificaciones de Rosenthal (1999)

1. Serín-proteasas.

Las serín-proteasas reciben su nombre por un residuo de serina reactiva en su sitio catalítico, que está involucrado en la catálisis del sustrato en el sitio activo (McKerrow y col., 1993) e inicia el ataque al grupo carbonilo del enlace peptídico, formando un intermediario de transición tetraédrico antes de la hidrólisis. Este intermediario es estabilizado por la unión del hidrógeno al anión oxígeno (Manson, 1991), y la orientación y accesibilidad al sitio de clivaje del enlace péptico del sustrato son importantes para determinar la especificidad de la enzima (Rosenthal, 1999). Las serín-proteasas (EC 3.4. 21), se dividen en 13 clanes y 40 familias (Rawlings y col, 2010); entre ellas, una de las más ampliamente identificadas y estudiadas, es la familia de las tripsinas (EC 3.4. 21.4), donde se encuentran algunas de las enzimas responsables de la digestión, coagulación sanguínea, fibrinólisis, fertilización, apoptosis entre otras (Di Cero, 2009).

A pesar de la gran cantidad de serín-proteasas identificadas y estudiadas, poco es lo que se conoce de este tipo de enzimas en parásitos protozoarios. En el género *Plasmodium falciparum* (parásito causante de la malaria), se han reportado que existen dos proteasas de la familia de las serín-proteasas (PfSUB-1 y PfSUB-2). Estas se expresan de forma exclusiva durante los estadios esquizonte y merozoito, postulándose que podrían estar relacionadas con el procesamiento de la proteína “Principal de Superficie de Merozoitos” (MSP-1) (Klemba y Goldberg, 2002). Además, se han identificado en *P. falciparum* y *P. chabaudi* otras dos serín-proteasas (p76 y p78 respectivamente), que podrían estar relacionadas con la invasión del parásito de los eritrocitos (Klemba y Goldberg, 2002).

Por otra parte en géneros patógenos pertenecientes a la familia Trypanosomatidae, se han descrito actividades serín-proteasa de tipo Oligopeptidasa B, como en *Trypanosoma brucei* (Troeberg y col, 1996), *Trypanosoma congolense* (Morty y col, 1999) y

Trypanosoma cruzi (Burleigh y Adrews, 1995; Silva-Lopez y col, 2008), encontrándose que tales actividades son capaces de hidrolizar sustratos naturales como vasopresina (Troeberg y col, 1996), y péptidos sintéticos como Cbz-Arg-Arg-AMC (Morty y col, 1999) y “ α -N-p-tosil-L-arginina-metil ester” (L-TAMED) (Silva-Lopez y col, 2008) a pH comprendidos entre 7,4 y 9. Esta Oligopeptidasa B, perteneciente a las serín oligopeptidasas de prolina (Klemba y Goldberg, 2002), es inhibida por inhibidores de serín-proteasas como el “N-p-tosil-L-lisina clorometil cetona” (TLCK) y “N-p-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona” (TPCK) (inhibidores de serín proteasas tipo tripsina y quimiotripsina respectivamente), y modulada por los iones calcio y zinc. Silva-Lopez y colaboradores (2008) reportaron que esta proteasa es secretada dentro del ambiente extracelular del bolsillo flagelar, postulando que pudiera estar asociada a eventos proteolíticos en los reservosomas. La función de esta enzima no está muy clara, pero posiblemente al no verse inhibida por serpinas y α_2 -macroglobulinas (Troeberg y col, 1996), puede permanecer activa en el torrente sanguíneo, degradando péptidos del hospedador, contribuyendo así con la patogénesis de la enfermedad.

En *Leishmania amazonensis* (Silva-Lopez y Giovanni-De-Simone, 2004; Alves y col, 2005), y en *Leishmania chagasis* (Silva-Lopez y col, 2010), ha sido descrita una actividad serín-proteasa. Esta enzima tiene actividad en un intervalo de pH comprendido entre 6 y 8 (Silva-Lopez y Giovanni-De-Simone, 2004). Esta actividad fue localizada en el bolsillo flagelar de los promastigotes de *Leishmania amazonensis* (Silva-Lopez y col, 2004) y *Leishmania chagasis* (Silva-Lopez y col, 2010), y en estructuras parecidas a los megasomas en amastigotes de *Leishmania amazonensis* (Silva-Lopez y col, 2004). Además, tiene una mayor actividad en la fase de promastigotes y disminuye en la fase de amastigotes axénicos (Alves y col, 2005), lo cual da indicios de la importancia que esta enzima podría tener en el proceso infectivo del parásito. Estudios con inhibidores de serín-proteasas sobre promastigotes de *Leishmania amazonensis*, demostraron que inhibidores de este tipo de

enzimas como “N-*p*-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona” (TPCK) y benzamidina (Bza), reducen sustancialmente la viabilidad del parásito y causa diversos cambios en la morfología de los promastigotes, específicamente en el bolsillo flagelar (Silva-Lopez y col, 2007).

Aunque las serin-proteasas de estos parásitos son esenciales para su supervivencia, su función en la fisiología queda aún por dilucidar. Tomando todos estos antecedentes los cuales dan indicio de la importancia de la actividad serín-proteasa, y que en tripanosomátidos monogenéticos no se han identificado esta clase de proteasas, nos propusimos estudiar las enzimas proteolíticas tipo serín-proteasas en el tripanosomátido no patógeno para el humano, *Leptomonas seymouri*, con el fin de ahondar en el entendimiento del papel que cumplen este tipo de enzimas en estos tripanosomatideos.

OBJETIVOS.

Objetivo general:

Estudio de la actividad serín-proteasa en la fracción soluble de promastigotes del trypanosomatideo *L. seymouri*.

Objetivos específicos:

1. Identificar la presencia de actividad tipo serín-proteasa en la fracción soluble de promastigotes de *L. seymouri*.
2. Caracterización bioquímica parcial de la actividad serín-proteasa presente en la fracción soluble de promastigotes de *L. seymouri*.
3. Estudiar el efecto de inhibidores de serín-proteasas sobre la proliferación y morfología de promastigotes de *L. seymouri* en cultivos “in vitro”.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1) Cultivo celular:

Se emplearon promastigotes de *L. seymouri*, suministrados por el Laboratorio de Biología Celular de Parásitos del Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, U.C.V. Los cultivos fueron mantenidos *in vitro* en értulas estériles de 100 ml de capacidad a temperatura ambiente, y cultivados en medio Schneider suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SFB).

El número de células, fue determinado por conteo directo en la cámara de Neubauer. Como una medida indirecta, se determinó la turbidez del cultivo, realizándose mediciones de transmitancia a una longitud de onda de 560 nm en un fotolorímetro Spectronic 20.

2) Obtención de Extractos Celulares:

Se tomaron células en fase de crecimiento logarítmica, se lavaron 3 veces con tampón fosfato salino (PBS) 300 mOsm pH 7,2 a 4°C. Fueron resuspendidas en PBS, para obtener 1×10^9 cel/ml. Se prepararon los homogenatos por sonicación sobre hielo (4°C), con un pistón 40T (LOW) y una potencia de salida 22.5 W. El homogenato obtenido fue ultracentrifugado a $100.000 \times g$ a 4°C, durante 1 hora. La fracción soluble (FS) obtenida fue distribuida en alícuotas de 1 ml y se almacenaron a -20° C.

3) Determinación de proteínas:

La cantidad de proteínas fue estimada mediante el método de Bradford (1976), utilizando como patrón Albúmina sérica de bovino (BSA) como proteína estándar.

4) Identificación y Caracterización de la actividad serín-proteasa presente en la FS de promastigotes de *L. seymouri*:

Para visualizar la actividad serin-proteasa de la FS de *L. seymouri* se emplearon tres ensayos: 4.1) zimogramas: la electroforesis en presencia de SDS y bajo condiciones no reductoras en un gel de poliacrilamida co-polimerizado con gelatina (1%) como sustrato, 4.2) la degradación del sustrato natural BSA, y 4.3) la hidrólisis del sustrato Bz-Arg-pNA (L-BAPNA), selectivo de esta familia de proteinasas.

4.1) Zimogramas:

Alícuotas de 50 µg de proteína de la FS de promastigotes de *L. seymouri*, fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida-gelatina a 80 V para apilar la muestra y 120 V para la separación. Tras la electroforesis, para remover el SDS, los geles fueron lavados dos veces durante 30 minutos con PBS 300mOsM pH 7,2 que contiene el detergente no iónico Tritón X-100 al 1%. Luego, los geles fueron lavados nuevamente ahora solo con PBS 300 mOsM pH 7,2., y luego se incubaron durante 48 horas a 37 °C en diferentes tampones: Tris HCl (100 mM) a pH 7 – 8 – 9 y tampón Glicina (100 mM) a pH 9,5 – 10. Al finalizar la incubación los geles fueron teñidos durante 1 hora con Azul de Coomassie R-250 y decolorados con una solución que contiene metanol-acido acético-agua (30:10:60).

4.2) Determinación de la actividad hidrolítica sobre el sustrato natural BSA.

Una concentración de 0,1 mg/ml de la FS, fue incubada con 5 mg/ml de BSA en tampón Tris HCl (50 mM) a pH 7 – 8 – 9 y/o en tampón Glicina (50 mM) a pH 9,5 – 10, en un volumen final de 200 µL a 37 °C durante 48 horas. La reacción fue detenida con 200 µL de tampón de muestra [60 mM Tris HCL, pH 6,8., 2% SDS, 10% (v/v) glicerol, y 0,025% Azul de Bromofenol] e incubada por 5 min a 100 °C. Posteriormente las muestras fueron

sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% bajo condiciones no reductoras, a 80 V para apilar la muestra y 120 V para la separación. Al finalizar la electroforesis, los geles fueron teñidos durante 1 hora con Azul de Coomassie R-250 y decolorados con una solución que contiene metanol-acido acético-agua (30:10:60).

4.3) Determinación de la actividad hidrolítica sobre *L*-BAPNA.

La determinación de la actividad hidrolítica sobre el sustrato cromogénico *L*-BAPNA, se realizó según el protocolo descrito por Erlanger y col (1961) con ligeras modificaciones. La FS de promastigotes de *L. seymouri* (0,1 mg/ml) fue incubada con el péptido (0,1-1 mM) en tampón Tris HCl (100 mM) a pH 8, en un volumen final de 200 µl a 37 °C durante 1 hora, con lecturas de densidad óptica cada 5min, Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. La liberación progresiva del cromóforo (p-nitroanilina) fue determinada mediante el aumento de la densidad óptica a una longitud de onda de 405 nm.

4.3.1) Efecto del pH sobre la hidrólisis del sustrato *L*-BAPNA por la FS de promastigotes de *L. seymouri*.

Los pH utilizados para caracterizar la actividad hidrolítica de la fracción soluble de promastigotes de *L. seymouri* sobre el sustrato cromogénico *L*-BAPNA fueron los siguientes: pH 4,0 (tampón acetato de sodio); pH 5.0 y 6.0 (tampón citrato de sodio); pH 7.0, 8.0 y 9.0 (tampón tris/HCl); pH 9.5 y 10 (tampón glicina).

4.3.2) Efecto de la concentración de sustrato *L*-BAPNA, sobre la hidrólisis del mismo por la FS de promastigotes de *L. seymouri*.

Las concentraciones de sustrato utilizadas para caracterizar la actividad hidrolítica de la fracción soluble de promastigotes de *L. seymouri* sobre el sustrato cromogénico *L*-BAPNA fueron: 0.1mM, 0.25mM, 0.5mM y 1mM.

4.3.3) Efectos de inhibidores de serín-proteasas, sobre la hidrólisis del sustrato L -BAPNA por la FS de promastigotes de *L. seymouri*.

Los inhibidores a utilizar para caracterizar la actividad hidrolítica de la FS de promastigotes de *L. seymouri* sobre el sustrato cromogénico L -BAPNA fueron: 10 μ M de “trans-epoxisuccinil-L-leucilamida -(4-guanidino)-butano” (E-64), específico de cisteín-proteinasas; 1 μ M de Pepstatina A, específico de aspartil-proteinasas; 5 mM de Fenantrolina para metalo-proteinasas; (0.25-1000 μ M) de “4-(2-Aminoetil) bencenosulfonilfluoruro, HCL)” (AEBSF) específico de serín-proteinasas; (0.01-300 μ M) de “N-*p*-tosil-L-lisina clorometil cetona” (TLCK) específico de serín-proteinasas; 1 mM de “Fenilmetilsulfonil fluoruro” (PMSF) específico de serín-proteinasas; 5 μ g/ml de Aprotinina, específico de serín-proteinasas y 100 μ M de Leupeptina para cisteín y serín proteinasas. Previo a la adición del sustrato, y la determinación de la actividad proteolítica como se explicó anteriormente; el inhibidor fue incubado con la FS durante 10 minutos a temperatura ambiente. La función "Four Parameter Logistic Curve" del programa SigmaPlot 8.0, fue utilizada para los cálculos del IC₅₀ correspondiente.

5) Efecto del inhibidor de serín-proteasas TLCK sobre la proliferación de promastigotes de *L. seymouri*.

Los parásitos fueron cultivados en presencia y/o en ausencia (ensayo control) de TLCK (1 μ M y/o 100 μ M), partiendo de una densidad celular de 2×10^6 promastigotes/ml en medio Schneider suplementado con 10% SFB, a temperatura ambiente y sin agitación. Se realizaron mediciones del número de células cada 24 horas durante 6 días consecutivos, chequeando la morfología de los mismos en el cultivo, empleando para ello un microscopio Olympus CK40 a 40 X. La estimación del número de células se realizó por conteo directo en

la cámara de Neubauer y en forma indirecta empleando un Spectronic 20 a 560 nm, basándose en una relación preestablecida entre la turbidez del cultivo, el porcentaje de transmitancia y el número de células/ml. Cada uno de los ensayos fueron realizados por triplicado.

6) Efectos del inhibidor de serín-proteasas TLCK sobre la morfología de promastigotes de *L. seymouri*.

Los parásitos se cultivaron en presencia y en ausencia de TLCK (1 μ M y/o 100 μ M), partiendo de una densidad celular de 2x10⁶ promastigotes/ml en medio Schneider suplementado con 10% SFB, a temperatura ambiente y sin agitación. Luego a las 48 h de crecidos los parásitos, se tomaron 2 ml de cada uno de los cultivos, posteriormente se le realizaron tres lavados con PBS 1X (300mOsM) pH7,2. Una vez resuspendidos los parásitos en solución, se procedió a la tinción con Giemsa según el protocolo descrito por Berman (1981) con modificaciones. Se tomó una gota y se colocó en un porta objeto, se fijaron con una gota de PAF, se realizó el “frotis”, se dejó secar, se fijaron los parásitos con metanol 70% y se dejaron secar, para luego ser teñidos con Giemsa 10%, durante 40 min, luego se dejaron secar, y se procedió a eliminar el exceso de Giemsa 10% y posteriormente fue observado al microscopio, empleando para ello un microscopio Olympus CK40 a 40 X.

RESULTADOS

1) Detección de la actividad serín-proteasa sobre geles poliacrilamida-gelatina, presente en la FS de promastigotes de *L. seymouri*.

Bajo nuestras condiciones experimentales, la FS de promastigotes de *L. seymouri* no fue capaz de hidrolizar la gelatina.

2) Degradación de BSA como sustrato natural, por la FS de promastigotes de *L. seymouri*.

La FS de promastigotes de *L. seymouri*, no fue capaz de degradar la BSA, bajo el intervalo de pH utilizado. (Figura 2)

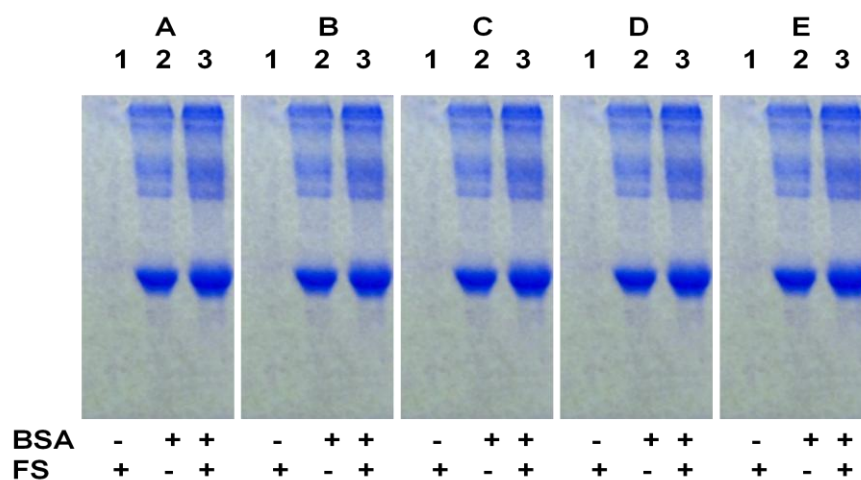


Figura 2. Visualización a través de SDS-PAGE de la degradación de BSA por la FS de promastigotes de *L. seymouri*. Ensayos: A) pH 7, B) pH 8, C) pH 9, D) pH 9,5., y E) pH 10. En todos los casos: línea 1, control con solo FS; línea 2, control con solo BSA; y línea 3, mezcla de la FS con BSA.

3) Hidrólisis del sustrato sintético L -BAPNA por la FS de promastigotes de *L. seymouri*.

La FS de promastigotes de *L. seymouri*, fue capaz de degradar a pH 8 el péptido sintético L -BAPNA selectivo para serín-proteasas (Figura 3), observándose una cinética tipo Michaelis-Menten (Figura 3 B).

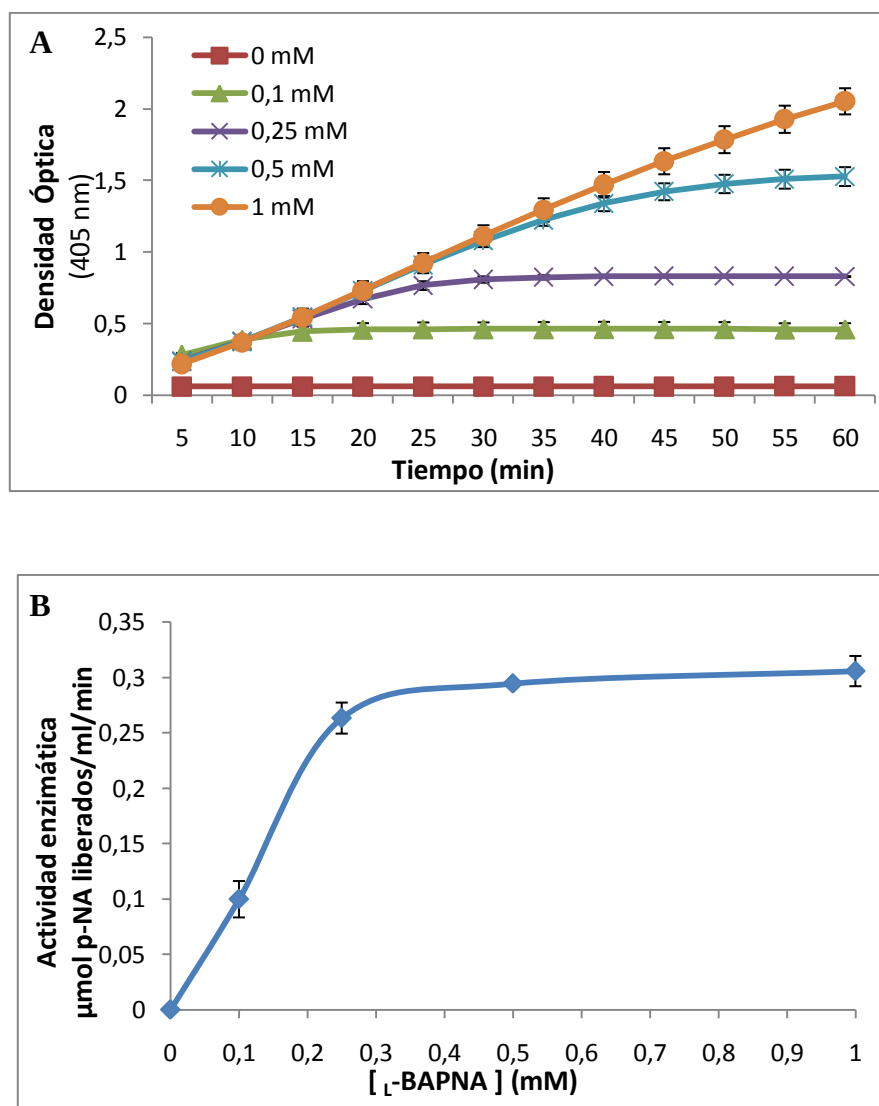


Figura 3. Hidrólisis del sustrato L -BAPNA por la FS de promastigotes de *L. seymouri*. **A)** Degradación de L -BAPNA en el tiempo. **B)** Cinética Michaelis-Menten. Los valores representan el promedio de tres (3) determinaciones, y las barras verticales la desviación estándar.

3.1) Efecto del pH sobre la hidrólisis del péptido sintético L -BAPNA por la FS de promastigotes de *L. seymouri*.

La FS de promastigotes de *L. seymouri* fue capaz de hidrolizar el péptido sintético L -BAPNA en un rango de pH comprendido entre pH 6 y 10, alcanzando un óptimo a pH 8. (Figura 4)

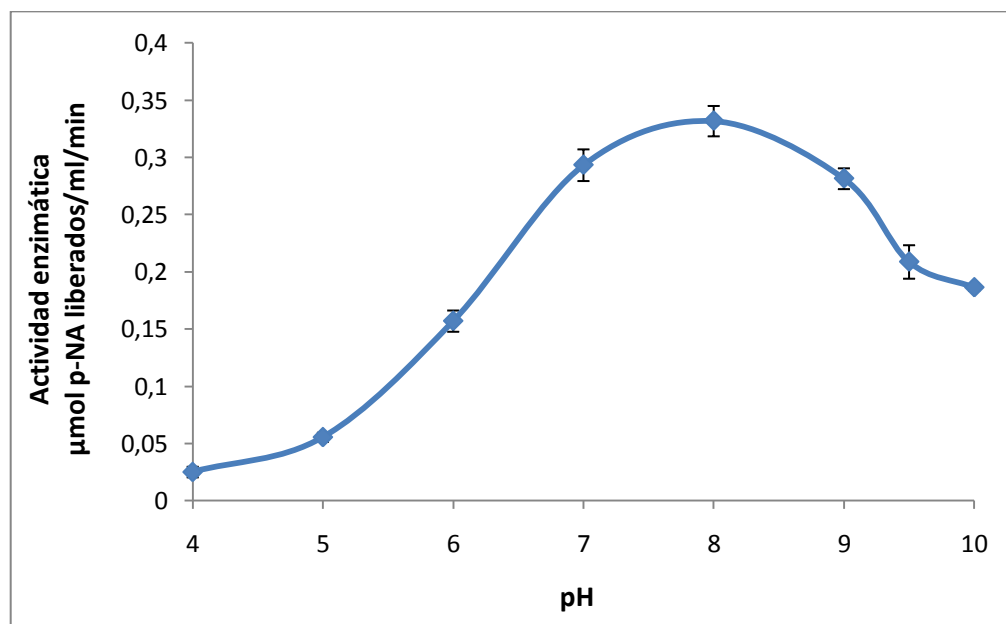


Figura 4. Efecto del pH sobre la hidrólisis del sustrato sintético L -BAPNA por la FS de promastigotes de *L. seymouri*. Los valores representan el promedio de tres (3) determinaciones y las barras verticales la desviación estándar.

3.2) Efecto de inhibidores de proteasas, sobre la hidrólisis del sustrato sintético L -BAPNA por la FS de promastigotes de *L. seymouri*.

En la figura 5, se puede observar el efecto de inhibidores específicos para las diferentes familias de proteasas sobre la hidrólisis del sustrato L -BAPNA por la FS de promastigotes de *L. seymouri* a pH 8. Solo los inhibidores específicos de serín-proteasas, TLCK, AEBSF, y el inhibidor selectivo de serín- y cisteín-proteasas, Leupeptina, fueron

capaces de inhibir la hidrólisis de péptido sintético (Figura 6 A). Además tanto el TLCK como el AEBSF, presentaron un IC_{50} de 0,0934 μ M y 1,3207 μ M, respectivamente (Figura 5 B, y Figura 5 C).

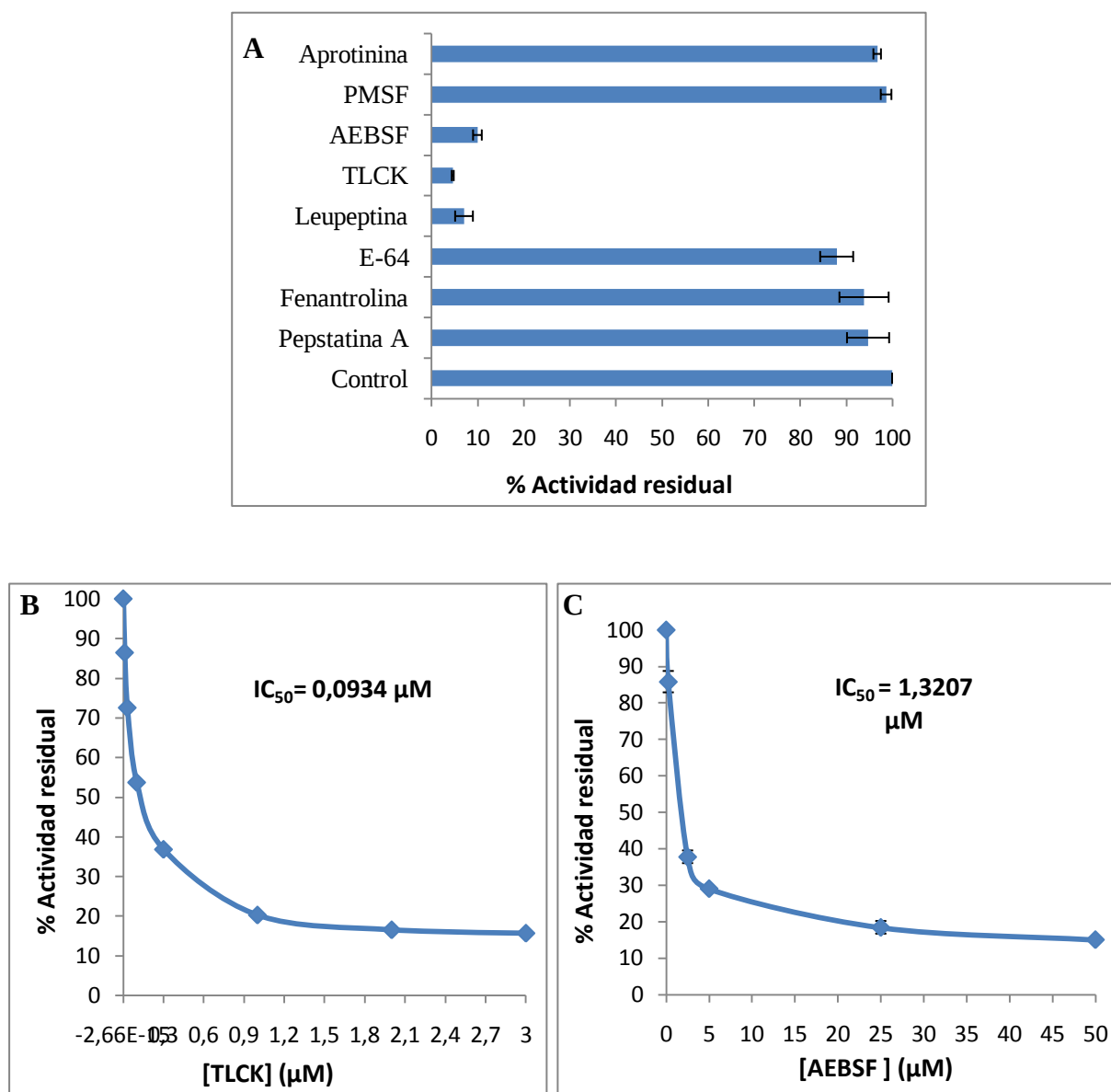


Figura 5. Efecto de los inhibidores de proteasas sobre la hidrólisis del sustrato sintético L-BAPNA por la FS de promastigotes de *L. seymouri*. **A)** Efecto de los inhibidores de proteasas Fenantrolina (5 mM), Aprotinina (5 μ g/ml), Pepstatina A (1 μ M), Leupeptina (100 μ M), PMSF (1 mM), AEBSF (1 mM), TLCK (100 μ M) y E-64 (10 μ M). **B)** Efecto de la concentración del inhibidor de serín-proteasas TLCK. **C)** Efecto de la concentración del inhibidor de serín-proteasas AEBSF. Los valores representan el promedio de tres (3) mediciones y las barras de error indican la desviación estándar.

4) Efecto del TLCK sobre la proliferación y morfología de promastigotes de *L. seymouri*.

En la Figura 6, se muestra el efecto del inhibidor selectivo de serín-proteasa (TLCK), sobre la proliferación de promastigotes de *L. seymouri* en cultivos “in vitro”. Este inhibidor no tuvo efecto sobre la proliferación celular en el rango de concentraciones utilizado. De igual manera tampoco se observó ningún cambio significativo en la morfología de los promastigotes del parásito (Datos no mostrados)

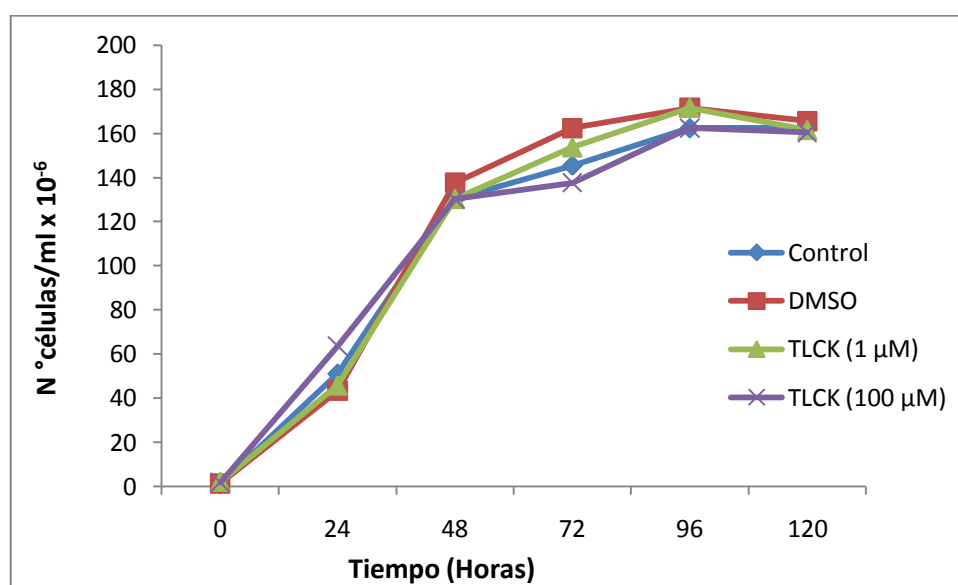


Figura 6. Curva de crecimiento de promastigotes de *L. seymouri* a diferentes concentraciones de TLCK. *DMSO, máxima concentración utilizada 1,6%. Los valores representan el promedio de (2) determinaciones.

DISCUSIÓN.

En parásitos protozoarios, las proteasas desempeñan un papel crítico tanto en los procesos biológicos de los mismos como en las relaciones que establecen con sus hospedadores, por esta razón una de las áreas con mayor desarrollo en la bioquímica de parásitos, ha sido el estudio de las enzimas proteolíticas. Hasta la fecha se han reconocido numerosas proteasas parasitarias; sin embargo, son el grupo de las serín-proteasas las menos estudiadas. En géneros patógenos pertenecientes a la familia de los Trypanosomatidae, han sido reportadas la presencia de actividades serín-proteasas, resaltando la importancia de esta familia de proteinasas en la supervivencia de los parásitos, sin embargo las funciones fisiológicas no están muy claras (Burleigh y Adrews, 1995; Troeberg y col., 1996; Morty y col., 1999; Silva-Lopez y Giovanni-De-Simone, 2004; Alves y col., 2005; Morty y col., 2005; Silva-Lopez y col., 2008; Silva-Lopez y col., 2010).

Los tripanosomátidos monogenéticos han sido ampliamente usados como modelos comparativos de estudio para ayudar a comprender la fisiología, la bioquímica, la ultraestructura y la genética de las especies patógenas (Schneider y Glaser, 1993; Jaffe y Dwyer, 2003). En parásitos monogenéticos del género *Leptomonas*, se ha identificado una metalo-proteasa homóloga a la gp63 del género *Leishmania* (Jaffe y Dwyer, 2003). Sin embargo hasta la fecha no hay ningún reporte de la presencia de actividades proteolíticas tipo serín-proteasas en estos parásitos; por lo cual, el estudio de actividades de este tipo en estos tripanosomátidos, son de gran importancia. Dichas investigaciones pudieran esclarecer el papel que desempeñan estas enzimas en estos flagelados.

El uso de métodos electroforéticos que permitan la visualización de actividades proteolíticas, como la SDS-PAGE que contenga acoplada una proteína como sustrato proteolítico, comúnmente llamada zimografía, ha sido ampliamente utilizado para evaluar

las proteasas en distintos sistemas biológicos (Branquinho y col, 1996). Uno de los sustratos más utilizados es la gelatina, ya que es fácilmente hidrolizada por varias proteasas y no tiende a migrar fuera de la resolución del gel a 4 °C, manteniendo así una distribución uniforme (Michaud y col, 1996). La zimografía ha sido una de las técnicas más útiles para el estudio de actividades proteolíticas en parásitos (Branquinho y col, 1996; Michaud y col, 1996; Jaffe y Dwyer, 2003; Santos y col, 2004), motivo por el cual en el nuestro estudio se utilizó para tratar de detectar la actividad serín-proteasa en la FS de promastigotes de *L. seymouri*. Sin embargo; bajo nuestras condiciones experimentales, la FS de promastigotes de *L. seymouri* no fue capaz de hidrolizar la gelatina como sustrato. No obstante, en *Leishmania donovani*, ha sido identificada una actividad serín-proteasa capaz de hidrolizar gelatina como sustrato inmerso en los geles de poliacrilamida (Choudhury y col, 2009; Choudhury y col, 2010).

Otros sustratos naturales como el colágeno, la BSA, el fibrinógeno, la hemoglobina, e inmunoglobulina G, han sido utilizados para identificar y caracterizar actividades serín-proteasas en algunos tripanosomátidos (Choudhury y col, 2009; Silva-Lopez y Giovanni-De-Simone, 2004; Silva-Lopez y col, 2008; Silva-Lopez y col, 2010; Troeberg y col, 1996). En este trabajo, se decidió evaluar la capacidad de la FS de degradar BSA. Sin embargo, la FS de *L. seymouri*, no fue capaz de hidrolizar este sustrato bajo nuestras condiciones experimentales (Figura 2). Otras serín-proteasas identificadas en *Trypanosoma brucei* (Troeberg y col, 1996), *Trypanosoma cruzi* (Silva-Lopez y col, 2008) y *Leishmania chagasi* (Silva-Lopez y col, 2010), tampoco hidrolizan BSA, pero si degrada péptidos sintéticos de tamaños pequeños como $_L$ -TAME (Silva-Lopez y col, 2008; Silva-Lopez y col, 2010), $_L$ -BAPNA (Silva-Lopez y col, 2008), Z-Arg-Arg-NHMec y Z-Phe-Arg-NHMec (Troeberg y col, 1996).

El péptido sintético $_L$ -BAPNA (Figura 7), selectivo para serín-proteasas, es uno de los sustratos cromogénicos más utilizados en el estudio de serín-proteasas tipo tripsina (Erlanger y col, 1961; Voytek y Gjenssing, 1970; Polgár, 1999; Coudhury y col, 2010), debido a que estas proteasas tienen especificidad por residuos de Arg o Lys en la posición P1 del sustrato (Schoellmann y Shaw, 1963; Gonias y Pizzo, 1983).

En este trabajo, la FS de promastigotes de *L. seymouri* fue capaz de hidrolizar el sustrato $_L$ -BAPNA (Figura 3), sugiriendo que la actividad serín-proteasa presente en la FS de promastigotes de *L. seymouri*, tiene selectividad por péptidos que contengan residuos de Arg en P1.

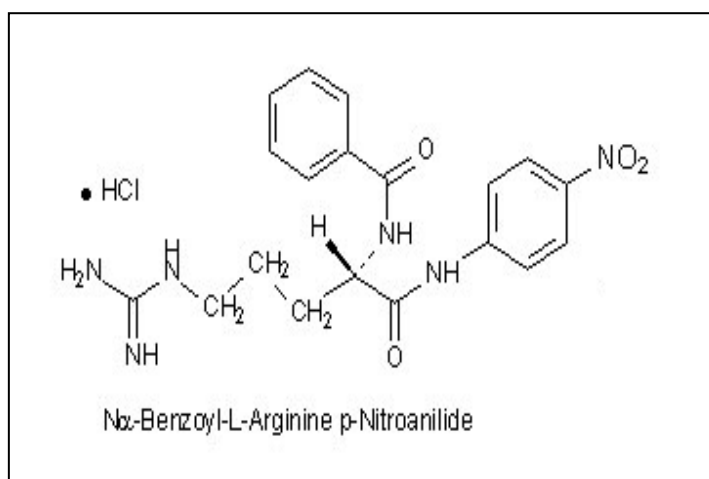


Figura 7. Estructura química del sustrato sintético $_L$ -BAPNA, selectivo para serín-proteasa. Tomado de www.sigma-aldrich.com.

Generalmente, las actividades tipo serín-proteasas de parásitos protozoarios son evidenciadas en rangos de pH óptimo comprendidos entre pH 7 y 8,8 (McKerrow y col, 1993). Sin embargo se han reportado serín-proteasas; como las de gusanos helmintos, que presentan un óptimo de pH alrededor de 9 a 11. Posiblemente, estas enzimas están adaptadas a diferentes ambientes para realizar diversas funciones en estos parásitos (Alcala-Canto y col, 2007). La actividad proteolítica presente en la FS de promastigotes de *L.*

seymouri, fue capaz de hidrolizar el sustrato sintético L-BAPNA en un rango de pH comprendido entre pH 6 y 10, mostrando un óptimo de actividad hidrolítica a pH 8 (Figura 4). De igual manera, en otros parásitos de la familia de los Trypanosomatidae, se han reportado actividades serín-proteasas haciendo uso de diferentes sustratos sintéticos, cuyos óptimos de actividad hidrolítica son a pH 8 (Silva-Lopez y Giovanni-De-Simone, 2004; Silva-Lopez y col, 2008; Choudhury y col, 2010; Silva-Lopez y col, 2010; Swenerton y col, 2010).

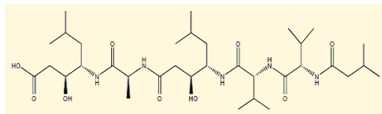
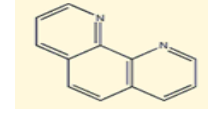
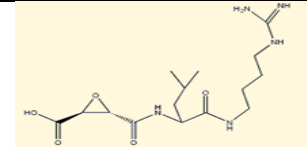
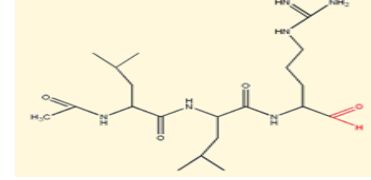
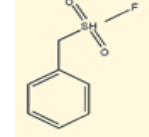
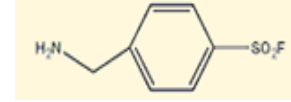
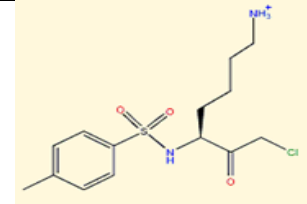
Ahondando en esta caracterización, se determinó a pH 8 el efecto de inhibidores específicos para las diferentes familias de proteasas (Tabla 2). Solo los inhibidores Leupeptina (100µM), TLCK (100µM) y AEBSF (1mM), tuvieron efecto sobre la hidrólisis del sustrato sintético L-BAPNA por la FS de promastigotes de *L. seymouri*. Además, tanto el TLCK como el AEBSF tuvieron un efecto dosis dependiente, presentando un IC₅₀ de 0,0934 µM y 1,307 µM respectivamente. Por otra parte, inhibidores de cisteín, aspartíl, y metalo-proteasas no tuvieron efecto sobre la hidrólisis del sustrato L-BAPNA, corroborando que la actividad enzimática en estudio corresponde a una actividad tipo serín-proteasa. Curiosamente, los inhibidores de serín-proteinasa Aprotinina y PMSF, no tuvieron efecto sobre la hidrólisis del sustrato sintético L-BAPNA. Este perfil de inhibición, ha sido reportado para serín oligopeptidasas de *Trypanosoma congolense* (Morty y col, 1999), y de *Leishmania* (Swenerton y col, 2010).

A pesar de que el AEBSF es un inhibidor muy similar al PMSF (Barretl y Rawlings, 1995), este último no tuvo efecto alguno sobre la hidrólisis del sustrato sintético L-BAPNA (Figura 5A). Las discrepancias en el efecto sobre la hidrólisis del sustrato sintético, podrían ser debido a las pequeñas diferencias estructurales de estos dos inhibidores (Tabla 2). El PMSF tienen un grupo metil extra entre el anillo bencilo y el sulfonilfluoruro, y el AEBSF

tiene un grupo amino-etil adicional unido al anillo bencilo. Estas diferencias al parecer posiblemente determinarían que el AEBSF, pero no el PMSF, pueda interactuar con el sitio activo de las enzimas presentes en la fracción soluble, y por ende provocando la inhibición de la actividad proteolítica.

Por otra parte, a pesar de que tanto la Aprotinina como el TLCK tienen residuos de lisina en su estructura (Tabla 2), el hecho de que el TLCK y no la Aprotinina tuviera efecto inhibitorio sobre la actividad serín-proteasa presente en la FS de los promastigotes de *L. seymouri*, podrían deberse al modo de acción de estos inhibidores. Ambos inhibidores, actúan uniéndose a las enzimas de una manera muy similar a la que se uniría el sustrato, pero solo el grupo clorometil presente en el TLCK interactúa sobre el residuo de histidina del sitio activo de las serín-proteinasas, ocasionando una inhibición irreversible.

Tabla 2. Inhibidores usados en la caracterización de la actividad enzimática.*

Inhibidor	Estructura	Tipo de inhibidor
Pepstatina A		Inhibidor reversible, específico de aspartil-proteasas, que actúa como un péptido análogo al sustrato en el estado de transición, inhibiendo de una manera competitiva a la proteasa.
Fenantrolina		Quelante de ión zinc, usualmente usado como inhibidor de Zn ⁺² metalo-proteasas.
E-64		Inhibidor irreversible de cisteín-proteasas, que actúa por aquilación de la cisteína del sitio activo de la enzima, abriendo el anillo epóxido.
Leupeptina		Inhibidor reversible de cisteín-proteasas y de serin-proteasa parecidas a la tripsina, que actúa imitando el intermediario tetraédrico formado durante la hidrólisis del enlace peptídico.
PMSF		Inhibidor irreversible de serin-proteasas, que actúa reaccionando con el hidroxilo de la serina del sitio activo, para formar un sulfonil en la enzima que es estable excepto a pH altos.
AEBSF		Inhibidor irreversible de serin-proteasas, muy similar al PMSF, que reacciona con el hidroxilo de la serina del sitio activo, formando un sulfonil en la enzima que es estable excepto a altos pH.
TLCK		Inhibidor irreversible de serin-proteasa tipo tripsina. La inhibición resulta de la unión de la proteína al inhibidor de una manera parecida al sustrato, seguido por la aquilación de la histidina del sitio catalítico de la enzima por el grupo clorometil del inhibidor.
Aprotinina		Inhibidor reversible de serin-proteasas, que actúa uniéndose a la enzima de una manera muy parecida a la que se une el sustrato.

*fuente: www.merops.sanger.ac.uk.

Dentro de las serín-proteasas, encontramos las Oligopeptidasas B, pertenecientes a la familia S9, de las oligopeptidasas de prolina, que forman parte del clan SC. Estas han sido encontradas en bacterias, plantas y tripanosomátidos. Todas estas enzimas, escinden enlaces peptídicos después de residuos aminoácidos básicos, preferiblemente arginina, similar a la actividad de la serín-proteasa tripsina (Rea y Fulop, 2006). Además, esta familia de proteasas, solo escinden péptidos pequeños, excluyendo proteínas de gran tamaño (Polgar, 2002). La actividad serín-proteasa detectada en la FS de promastigotes de *L. seymouri*, presentó similitudes con las Oligopeptidasas reportadas en algunas especies del género *Trypanosoma* y *Leishmania*. Entre estas similitudes destacan: la serín-oligopeptidasa de *Trypanosoma cruzi*, no degradó gelatina, es capaz de hidrolizar sustratos peptídicos pequeños que contienen Arg en P1 (L -TAME y L -BAPNA) con un pH óptimo de 8 (Silva-Lopez y col, 2008); de igual manera que en *Trypanosoma brucei* (Troeberg y col, 1996) y en *Trypanosoma congolense* (Morty y col, 1999). Por otra parte, en *Leishmania*, la actividad oligopeptidasa B medida sobre el péptido sintético Z-Pro-Arg-AMC a pH 8, fue totalmente inhibida por AEBSF (2mM), Leupeptina (100 μ M) y TLCK (100 μ M); pero no por Aprotinina (1 μ M) ni PMSF (1mM) (Swenerton y col, 2010). Sin embargo, son necesarios más estudios, para poder establecer que la actividad presente en la FS de estos parásitos, correspondería a la de una Oligopeptidasas B, ya que en este trabajo nos enfocamos en el estudio de una fracción de proteínas solubles y no enzimas totalmente purificadas.

En parásitos tripanosomátidos patógenos para el humano, las serín-proteasas presentan numerosas funciones. Esta clase de enzimas proteolíticas facilitan la invasión de las células del hospedador, participan en la degradación de péptidos del hospedador, regulan los niveles de enolasa en la superficie celular, ayudan al parásito a evadir la respuesta inmune del hospedador, entre otras (Troeberg y col, 1996; Morty y col, 1999; Silva-Lopez y

col, 2008; de Matos Guedes y col, 2007; Swenerton y col, 2010); contribuyendo con la patogénesis de las enfermedades causadas por estos parásitos protozoarios.

Adicionalmente se ha reportado que estas enzimas pudieran tener un papel importante en la proliferación celular. Schnebli y Burger (1972), realizaron estudios del efecto del TLCK (0,1 mM) sobre la proliferación celular, donde observaron una disminución en la proliferación de las células transformadas de fibroblastos de ratón (Py3T3, SV3T3, 3TI2) y de riñón de hámster (PyBHK). Sugiriendo la importancia de las actividades proteolíticas en la proliferación de estos tipos de células. Sin embargo, no se han reportado actividades serín-proteasas, que estén involucradas en la proliferación celular de tripanosomátidos monogenéticos. Dentro de este contexto, se evaluó el efecto del inhibidor de serín-proteasa TLCK, sobre la proliferación y la morfología de los promastigotes de *L. seymouri*.

Los resultados obtenidos en este trabajo, revelan que a pesar del fuerte efecto inhibitorio del TLCK sobre la actividad enzimática presente en la FS, este inhibidor a concentraciones diez veces y mil veces mayores al IC₅₀ reportado para la fracción soluble, no tuvo efecto alguno sobre la proliferación celular y la morfología de los promastigotes de *L. seymouri*. Estos resultados parecen indicar que la actividad serín-proteasas identificada en este trabajo, no está asociada a los eventos de proliferación de estos parásitos. Sin embargo son necesarios más estudios con inhibidores de serín-proteasas como el AEBSF, entre otros; para poder aclarar si la actividad serín-proteasa presente en esta FS pudiera o no estar involucrada en la proliferación celular.

Los resultados obtenidos en este estudio, abren las puertas a la realización de futuros trabajos orientados hacia la profundización de las características bioquímicas, moleculares y estructurales de esta clase de proteasas en este tripanosomátido; así como su posible rol biológico.

CONCLUSIONES.

1. Se demostró por primera vez la presencia de una actividad tipo serín-proteasa en la FS de promastigotes de *L. seymouri*. Esta fue capaz de degradar el sustrato sintético L -BAPNA en un rango de pH 6 a 10 con un óptimo de actividad a pH8, generando una cinética tipo Michaelis-Menten. Adicionalmente, la actividad proteolítica fue totalmente inhibida por TLCK, AEBSF y Leupeptina. Curiosamente no fue inhibida por PMSF ni por Aprotinina.
2. La actividad serín-proteasa presente en la FS de promastigotes de *L. seymouri*, no fue capaz de degradar sustratos proteicos de gran tamaño como gelatina y BSA, bajo nuestras condiciones experimentales.
3. El inhibidor de serín-proteasas TLCK, no presentó efectos antiproliferativos sobre los cultivos de promastigotes de *L. seymouri*. De igual manera tampoco tuvo efecto sobre la morfología de los parásitos.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1) Alcala-Canto, Y., Alberti-Navarro, A., Ibarro-Velarde, F. 2007. Serine protease activity demonstrated in the larval stage of the pentastomid *Linguatula serrata*. *Parasitol Res.* **100**: 1011-1014.
- 2) Alves, C.R., Corte-Real, S., Bourguignon, S.C., Chaves, C.S. y Saraiva, E.M.B. 2005. *Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote-amastigote differentiation in vitro. *Parasitology.* **109**: 38-48.
- 3) Ashall, F. 1990. Characterisation of an alkaline peptidase of *Trypanosoma cruzi* and other trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* **38**: 77-87.
- 4) Barrett, A.J., Rawlings, N.D. 1995. Families and clans of serine peptidases. *Arch. Biochem Biophys.* **318**: 247-250.
- 5) Barrett, A.J., Rawlings, N.D. y O` Brien, E.A. 2001. The MEROPS database as a protease information system. *J. Struct. Biol.* **134**: 95-102.
- 6) Berman, J.D. 1981. Activity of imidazoles against *Leishmania tropica* in human macrophages cultures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **30**: 566-569.
- 7) Bernard, F. y Schrevel, J. 1987. Purification of a *Plasmodium berghei* neutral endopeptidase and its localization in merozoite. *Mol. Biochem. Parasitol.* **26**: 167-174.
- 8) Beynon, R.J. y Bond, J.S. 1989. Proteolytic enzymes, 1ª edición. Editorial IRL Press. Oxford-Inglaterra.
- 9) Bonaldo, M.C., d'Escoffier, L.N., Salles, J.M. y Goldenberg, S. 1991. Characterisation and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Exp Parasitol.* **73**: 44-51.

- 10) Bouvier, J., Etges, R.J. y Bordier, C. 1985. Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *Leishmania* promastigotes. *J Biol Chem.* **260**: 15504-15509.
- 11) Bouvier, J., Schneider, P. y Etges, R. 1995. Leishmanolysin: surface metalloproteinase of *Leishmania*. *Method Enzymol.* **248**: 614-633.
- 12) Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-254.
- 13) Braun-Breton, C., Rosenberry, T.L. y Pereira da Silva, L. 1988. Induction of the proteolytic activity of a membrane protein in *Plasmodium falciparum* by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Nature.* **332**: 457-459.
- 14) Branquinha, M.H., Vermelho, A.B., Goldenberg, S. y Bonaldo, M.C. 1996. Ubiquity of cysteine- and metalloproteinase in a wide range of trypanosomatids. *J Eukaryot. Microbiol.* **43**: 131-135.
- 15) Burleigh, B.A. y Andrews, N.W. 1995. A 120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca^{+2} -signalling factor for mammalian cell. *J Biol Chem.* **270**: 5172-5180.
- 16) Camargo, E.P. 1999. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv Parasit.* **42**: 29-112.
- 17) Cazzulo, J.J., Couso, R., Raimondi, A., Wernstedt, C. y Hellman, U. 1989. Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* **33**: 33-41.

- 18) Cazzulo, J.J., Cazzulo Franke, M.C., Martinez, J. y Franke de Cazzulo, B.M. 1990. Some kinete properties of a cystein proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Acta*. **1037**: 189-191.
- 19) Chang, K.P., Chaudhuri, G. y Fong, D. 1990. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. *Annu Rev of Microbiol*. **44**: 499-529.
- 20) Chang, K.P., Reed, S.G., Mcgwire, B.S. y Soong, L. 2003. *Leishmania* model for microbial virulence the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop*. **85**: 375-390.
- 21) Cheng, T. 1978. Parasitología General. 2º edición. Editorial AC, Libros científicos y técnicos. Madrid-España.
- 22) Choi, W.Y., Nam, H.W. y Youn, J.H. 1989. Characterization of proteases of *Toxoplasma gondi*. *Korean J Parasitol*. **27**: 161-170.
- 23) Choudhury, R., Bhaumik, S.K., De, T. y Cakraborti, T. 2009. Identification, purification, and characterization of a secretory serine protease in an Indian strain of *Leishmania donovani*. *Mol Cell Biochem*. **320**: 1-14.
- 24) Choudhury, R., Das, P., De, T. y Chakraborti, T. 2010. Immunolocalization and characterization of two novel proteases in *Leishmania donovani*: Putative roles in host invasión and parasite development. *Biochimie*. **92**: 1274-1286.
- 25) Coombs, G.H. 1982. Proteinases of *Leishmania mexicana* and other flagellate protozoa. *Parasitology*. **84**: 149-155.
- 26) Coombs, G.H. y North, N.J. 1983. An analysis of the proteinases of *Trichomonas vaginalis* by polyacrylamide gel electrophoresis. *Parasitology*. **86**: 1-6.

- 27) Coombs, G.H., Goldberg, D.E., Klemba, M., Berry, C.; Kay, J. y Mottran, J.C. 2001. Aspartic protease of *Plasmodium falciparum* and other parasitic protozoa as drug targets. *TRENDS Parasitol.* **17(11)**: 532-537.
- 28) Croft, S.L. y Coombs, G.H. 2003. Leishmaniasis-Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *TRENDS. Parasitol.* **19**: 502-508.
- 29) Curley, G.P., O'Donovan, S.M., McNally, J., Mullally, M., O'Har, H., Troy, A., O'Callaghan, S.A. y Dalton, J.P. 1994. Aminopeptidases from *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium chabaudi* and *Plasmodium berghei*. *J Eukaryot Microbiol.* **41**: 119-123.
- 30) Dame, J.B., Reddy, G.R., Yowell, C.A., Dunn, B.M., Kay, J. y Berry, C. 1994. Sequence, expression and modeled structure of an aspartic proteinase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* **64**: 117-190.
- 31) de Matos GUedes, H.L., Carneiro, M.P., Gomes, D:C:, Rossi-Bergmanmn, B., de Simone, S.G. 2007. Oligopeptidase B from *L. amazonensis*: molecular cloning, gene expression analysis and molecular model. *Parasitol Res.* **101**: 853-863.
- 32) Eakin, A.E., Mills, A.A., Harth, G., Mckerrow, J.H. y Crak, C.S. 1992. The sequence, organization and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* **267**: 7411-7420.
- 33) El-Sayed, N.M.A. y Donelson, J.E. 1997. African trypanosomes have differentially expressed genes encoding homologues of the *Leishmania* Gp63 surface protease. *J Biol Chem.* **272**: 26742-26748.
- 34) Erlarger, B.F., Kokowsky, N. y Cohen, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys.* **95**: 271-278.

- 35) Gleib, M.H. y Wim, G.J. 2002. Drug to combat tropical protozoan parasites. *Science*. **279**: 343-344.
- 36) Golderbg, D.E., Slater, A.F.G., Bavis, R., Chait, B., Cerami, A. y Henderson, G.B. 1991. Hemoglobin degradation in the human malaria pathogen *Plasmodium falciparum*: a catabolic pathway initiated by a specific aspartic protease. *J Exp Med*. **173**: 961-969.
- 37) Gonias, S.L. y Pizzo, S.V. 1983. Conformation and Protease Binding Activity of Binary and Ternary Human α_2 -Macroglobulin-Protease complexes. *J Biol Chem*. **258**: 14682-14685.
- 38) Gonzalez, J., Ramalho-Pinto, F.J., Frevert, U., Ghiso, J., Tomlinson, S., Scharfstein, J., Corey, E.J. y Nussenzweig, V. 1996. Proteasome activity is required for the stage-specific transformation a protozoan parasite. *J Exp Med*. **184**: 1909-1918.
- 39) Grelliery, P., Picacrd, I., Bernard, F., Mayer, R., Heidrich, H.G., Monsigny, M. y Schrevel, J. 1989. Purification and identification of a neutral endopeptidase in *Plasmodium falciparum* schizonts and merozoites. *Parasitology Res*. **75**: 455-460.
- 40) Hare, D.F., Jorroll, E.L. y Lindmark, D.G. 1989. *Giardia lamblia*: characterization of proteinase activity in trophozoites. *Exp Parasitol*. **68**: 168-175.
- 41) Hill, J., Tyas, L., Phylip, L.H., Kay, J., Dunn, B.M. y Berry, C. 1994. High level expression and characterization of the plasmepsin II, an aspartic proteinases from *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett*. **352**: 155-158.
- 42) Huel, G., Richet, C., Demeyer, D., Bisiau, H., Soudan, B., Tetaert, D., Han, K.K. y Degand, P. 1992. Characterization of diferfernt proteolytic activities in *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochim Biophys Acta* **1138**: 213-221.

- 43) Jaffe, C.L. y Dwyer, D.M. 2003. Extracellular release of the surface metalloprotease, gp63, from *Leishmania* and insect trypanosomatids. *Parasitol. Res.* **91**: 229-237.
- 44) Keene, W.E., Pettitt, M.G., Allen, S. y McKerrow, J.H. 1986. The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med.* **163**: 536-549.
- 45) Klemba, M. y Goldberg, D.E. 2002. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annu Rev Biochem.* **71**: 275-305.
- 46) Kornblatt, M.J., Mpimbaza, G.W. y Lonsdale-Eccles, J.D. 1992. Characterization of an endopeptidase of *Trypanosoma brucei brucei*. *Arch Biochem Biophys.* **293**: 25-31.
- 47) Locwod, B.C., North, M.J., Scott, K.I., Bremner, A.F. y Coombs, G.H. 1987. The use of a highly sensitive electrophoretic method to compare the proteinases of trichomonads. *Mol Biochem Parasitol.* **24**: 89-95.
- 48) Lonsdale-Eccles, J.D. y Mpimbaza, G.W.N. 1986. Thiol-dependent proteases of African trypanosomes. Analysis by electrophoresis in sodium dodecyl sulphate/polyacrilamide gels co-polymerized with fibrinogen. *Eur J Biochem.* **155**: 469-473.
- 49) Lonsdale-Eccles, J.D. y Grab, D.J. 1987. Lysosomal and non-lysosomal peptide hydrolases of the bloodstream forms of *Trypanosome brucei*. *Eur J Biochem.* **169**: 467-475.
- 50) Luaces, A.L. y Barrett, A.J. 1988. Affinity purification and biochemical characterization of hystolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochem J.* **250**: 903-909.
- 51) Luashbaugh, S.B., Hofbauer, A.F. y Pittmn, F.E. 1985. *Entamoeba histolytica*: purification of cathepsin B. *Exp Parasitol.* **59**: 328-336.

- 52) Mason, R.W. 1991. Proteinases of mammals: an overview. En: Biochemical protozoology. Editado por: Grahams Michael North.pp:168-179.
- 53) Mayer, R., Picard, I., Lawton, P., Grellier, P., Barrault, C., Monsigny, M. y Schrevel, J. 1991. Peptide derivatives specific for a *Plasmodium falciparum* proteinase inhibit the human erythrocyte invasion by merozoites. *J Med Chem.* **34**: 3029-3035.
- 54) McGhee, R.B. y Cosgrove, W.B. 1980. Biology and physiology of the lower trypanosomatids. *Microbiol Rev.* **44**: 140-173.
- 55) McKerrow, J.M. 1989. Parasite Protease. *Exp Parasitol.* **68**: 111-115.
- 56) McKerrow, J.H., Sun, E., Rosenthal, P. y Bouvir, J. 1993. The proteases and pathogenicity of parasite protozoa. *Annu Rev Microbiol.* **47**: 821-853.
- 57) Michaud, D., Cantin, L., Raworth, D.A. y Vrain, T.C. 1996. Assessing the stability of cystatin/cysteine proteinase complexes using mildly-denaturing gelatin-polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis.* **17**: 74-79.
- 58) Morty, R.E., Authié, E., Troeberg, L., Lonsdale-Eccles, J.D. y Coetzer, T.H.T. 1999. Purification and characterization of a Trypsin-like serine oligopeptidase from *Trypanosoma congolense*. *Mol Biochem Parasitol.* **102**: 145-155.
- 59) Morty, R.E., Pelle, R., Vadasz, I., Uzcanga, G.L., Seeger, W., Bubis, J. 2005. Oligopeptidase B from *Trypanosoma evansi*: A parasite peptidase that inactivates atrial natriuretic factor in the bloodstream of infected hosts. *J Biol Chem.* **280**: 10925-10937.
- 60) Munoz, M.L., Calderon, J. y Rojkind, M. 1982. The collagenase of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med.* **155**: 42-41.

- 61) Neale, K.A. y Alderete, J.F. 1990. Analysis of the proteinases of representative *Trichomonas vaginalis* isolate. *Infect Immun.* **58**: 157-162.
- 62) Nesterenko, M.V., Tilley, M. y Upton, S.J. 1995. A metallo-dependent cysteine proteinase of *Cryptosporidium parvum* associated with the surface of sporozoites. *Microbios.* **83**: 77-88.
- 63) Nogueira de Melo, A.C., Giovanni-de-Simone, S., Branquinha, M.H. y Vermelho, A.B. 2001. Crithidia guilhermei: purification and partial characterization of a 62-kDa extracellular metalloproteinase. *Exp Parasitol.* **97**: 1-8.
- 64) North, M.J., Coombs, G.H. y Barry, J.D. 1983. A comparative study of the proteolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperum*, *T. evansi*, *T. vivax*, *Leishmania tarentolae* and *Crithidia fasciculata*. *Mol Biochem Parasitol.* **9**: 161-180.
- 65) North, M.J., Robertson, C.D. y Coombs, G.H. 1990. The specificity of trichomonad cysteine proteinases analysed using fluorogenic substrate and specific inhibitors. *Mol Biochem Parasitol.* **39**: 183-193.
- 66) Olafson, R.W., Thomas, J. R., Ferguson, M.A., Dwek, R.A., Chaudhuri, M., Chang, K.P. y Rademacher, T.W. 1990. Structure of the N-linked oligosaccharides of gp63, the major surface glycoprotein, from *Leishmania mexicana amazonensis*. *J Biol Chem.* **265**: 12240-12247.
- 67) Parenti, D.M. 1989. Characterization of a thiol proteinases in *Giardia lamblia*. *J Infect Dis.* **160**: 1076-1080.
- 68) Polgar, L. 1999. Oligopeptidase B. A new type of serine peptidase with a Unique Substrate-Dependent Temperature Sensitivity. *Biochemistry.* **38**: 15548-15555.
- 69) Polgar, L. 2002. The prolyl oligopeptidasa family. *Cell Mol Life Sci.* **59**: 349-362.

- 70) Pupkis, M.F. y Coombs, G.H. 1984. Purification and characterization of proteolytic enzymes of *Leishmania mexicana mexicana* amastigotes and promastigotes. *J Gen Microbiol.* **130**: 2375-2383.
- 71) Pupkis, M.F., Tetley, L. y Coombs, G.H. 1986. *Leishmania mexicana*: amastigotes hydrolases in unusual lysosomes. *Exp Parasitol.* **62**: 29-39.
- 72) Rawlings, N.D., Morton, F.R., Kok, C.Y., Kong, J. y Barrett, A.J. 2010. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **36**: D320-D325.
- 73) Ridley, R. 1997. Plasmodium: Drugs discovery and development- an industrial perspective. *Experim Parasitol.* **87**: 293-304.
- 74) Rea, D. y Fulop, V. 2006. Structure-function properties of prolyl oligopeptidase family enzymes. *Cell Biochem Biophys.* **44**: 349-365.
- 75) Robertson, C.D. y Coombs, G.H. 1990. Characterization of three groups of cysteine proteinases in the amastigotes of *Leishmania mexicana mexicana*. *Mol Biochem Parasitol.* **42**: 269-276.
- 76) Robertson, C.D., North, M.J., Lockwood, B.C. y Coombs, G.H. 1990. Analysis of the proteinases of *Trypanosoma brucei*. *J Gen Microbiol.* **136**: 921-925.
- 77) Rosales-Encina, J.L., Campos-Salazar, M.S. y Rojkind Matluk, M. 1992. *Entamoeba histolytica* collagen binding proteins. *Arch Med Res.* **23**: 109-113.
- 78) Rosenthal, P.J., Kim, K., Mckerrow, J.H. y Leech, J.H. 1987. Identification of three stage-specific proteinases of *Plasmodium falciparum*. *J Exp Med.* **166**: 816-821.

- 79) Rosenthal, P.J., Mckerrrow, J.H., Aikawa, M., Nagasawa, H. y Leech, J.H. 1988. A malarial cysteine proteinase is necessary for haemoglobin degradation by *Plasmodium falciparum*. *J Clin Invest.* **82**: 1560-1566.
- 80) Rosenthal, P.J. y Nelson, R.G. 1992. Isolate and characterization of a cysteine proteinases gene of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* **51**: 143-152.
- 81) Rosenthal, P. 1999. Proteases of Protozoan Parasites. *Adv Parasitol.* **105**: 143-159.
- 82) Santana, J.M., Grellier, P., Rodier, M.H., Schrevel, J. y Teixeira, A. 1992. Purification and characterization of a new 120 KDa alkaline proteinases of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun.* **187**: 1466-1473.
- 83) Santana, J.M., Grellier, P., Schrevel, J. and Teixeira, A. 1997. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 KDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochim J.* **325**: 129-137.
- 84) Santos, A.L.S., Abreu, C.M., Alviano, C.S. y Soares, M.A. 2005. Use of proteolytic enzymes as an additional tool for Trypanosomatid identification. *Parasitology.* **130**: 79-88.
- 85) Santos, A.L.S., d' Avila-Levy, C.M., Elias, C.G.R., Vermelho, A.B. y Branguinha, M.H. (2007). *Phytomonas serpens*: immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens. *Microbes Infect.* **9**: 915-921.
- 86) Schnebli, H.P. y Burger, M. 1972. Selective Inhibition of Growth of transformed cell by protease inhibitors. *Cell Biology.* **69**: 3825-3827.

- 87) Schneider, P. y Glaser, T.A. 1993. Characterization of a surface metalloprotease from *Herpetomonas samuelpessoai* and comparison with *Leishmania major* promastigote surface protease. *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**: 277-282.
- 88) Schoellmann, G. y Shaw, E. 1963. Direct evidence for the presence of histidine in the active center of chymotrypsin. *Biochemistry* **2**: 252–255.
- 89) Scholze, H. y Werries, E. 1984. A weakly acidic protease has a powerful proteolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* **11**: 293-300.
- 90) Scholze, H., Frey, S., Cejka, Z. y Bakker-Grunwald, T. 1996. Evidence for the existence of both proteasome and a novel high molecular weight peptidase in *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem.* **271**: 6212-6216.
- 91) Schrevel, J., Grellier, P., Mayer, R. y Monsigny, M. 1988. Neutral proteases involved in the reinvasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *Biol Cell.* **64**: 233-244.
- 92) Silva-Lopez, R.E. y Giovanni-De-Simone, S. 2004. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: purification and characterization of a promastigote serin protease. *Exp Parasitol.* **107**: 173-182.
- 93) Silva-Lopez, R.E., Morgado-Díaz, J.A., Alves, C.R., Côte-Real, S. y Giovanni-De-Simone, S. 2004. Subcellular localization of an extracellular serine protease in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitol Res.* **93**: 328-331.
- 94) Silva-Lopez, R.E., Morgado-Díaz, J.A., Chávez, M.A. y Giovanni-De-Simone, S. 2007. Effects of serine protease inhibitors on viability and morphology of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes. *Parasitol Res.* **101**: 1627-1635.

- 95) Silva-Lopez, R.E., Morgado-Díaz, J.A., Tavares, P. y Giovanni-De-Simone, S. 2008. Purification and subcellular localization of a secreted 75 KDa *Trypanosoma cruzi* serine oligopeptidase. *Acta Tropica*. **107**: 159-167.
- 96) Silva-Lopez, R.E., Santos, T.R., Morgado-Díaz, J.A., Tanaka, M.N. y Giovani-De-Simone, S. 2010. Serine protease activities in *Leishmania (Leishmania) chagasi* promastigotes. *Parasitol Res*. **107**: 1151-1162.
- 97) Swenerton, R.K., Zhang, S., Sajid, M., Medzihradszky, K.F., Craik, C.S., Kelly, B.L. y McKerrow, J.H. 2010. The Oligopeptidase B of *Leishmania* regulates parasite enolase and immune evasion. *J Biol Chem*. **286**: 429-440.
- 98) Troeberg, L., Pike, R.N., Morty, R.E., Berry, R.K., Coetzer, T.H.T. y Lonsdale-Eccles, J.D. 1996. Proteases from *Trypanosoma brucei brucei*. Purification, characterization and interactions with host regulatory molecules. *Eur. J Biochem*. **238**: 728-736.
- 99) Valdivieso, E., Dagger, F. y Rascón, A. 2006. *Leishmania mexicana*: Identification and characterization of an aspartyl proteinases activity. *Exp Parasitol*. **116**: 77-82.
- 100) Vander Jagt, D.L., Hunsaker, L.A., Campos, N.M. y Scaletti, J.V. 1992. Localization and characterization of hemoglobin-degrading aspartic proteinases from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem Biophys Acta*. **1122**: 256-264.
- 101) Voytek, P. y Gjessing, E.C. 1970. Studies of an Anionic Trypsinogen and its Active Enzyme from Porcine Pancreas. *J Biol Chem*. **246**: 508-516.
- 102) VicKerman, K. 1994. The exolutonary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol*. **24**: 1317-1331.

- 103) Wang, C.C. 1997. Validating targets from antiparasite chemotherapy. *Parasitology*. **114**: S31-S44.
- 104) Werries, E., Franz, A., Hippep, H. y Acil, Y. 1991. Purification and substrate specificity of two cysteine proteinases of *Giardia lamblia*. *J Protozool*. **38**: 378-383.